11 月 November
2020, 63(11): 1333 – 1344
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http: //www. insect. org. cn
doi: 10.16380/j. kcxb. 2020.11.006

家蚕 BmPGRP-S5 蛋白的抑菌活性及其在细胞免疫中的作用

陈 雪[1], 周 虹[1], 李晓凤[1], 肖 阳[2], 钟仰进[1], 杨婉莹[1,*]

(1. 华南农业大学动物科学学院, 广东省农业动物基因组学与分子育种重点实验室, 广州 510642;
2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 广州 510610)

摘要:【目的】肽聚糖识别蛋白(peptidoglycan-recognition proteins, PGRP)可以特异性识别细菌细胞壁中的肽聚糖(peptidoglycan, PGN),并通过免疫缺陷(immune deficiency, IMD)途径和 Toll 途径诱导昆虫抗菌肽的产生。本研究旨在探讨家蚕 *Bombyx mori* 肽聚糖识别蛋白 BmPGRP-S5 的抑菌活性及在引发家蚕细胞免疫中的作用。【方法】用果蝇胚胎 S2 细胞表达 BmPGRP-S5 蛋白;通过细菌生长曲线法检测 BmPGRP-S5 蛋白对大肠杆菌 *Escherichia coli* K_{12} D_{31}、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* 的抑菌活性;ELISA 检测 BmPGRP-S5 蛋白与大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 胞壁组分的结合力;通过测定吸光值和观察家蚕血淋巴黑化反应分析 BmPGRP-S5 对细菌胞壁组分激活酚氧化酶原(prophenoloxidase, PPO)的影响,并通过异硫氰酸荧光素(FITC)标记法检测 BmPGRP-S5 对家蚕血细胞吞噬细菌的影响。【结果】获得表达纯化的 BmPGRP-S5 蛋白。BmPGRP-S5 蛋白对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 $K_{12}D_{31}$ 和巨大芽孢杆菌无抑菌效果,加入 40 μmol/L 的 Zn^{2+} 后,其对巨大芽孢杆菌的抑菌效果明显增强。ELISA 结果表明,BmPGRP-S5 蛋白与来自金黄色葡萄球菌的 PGN 和枯草芽孢杆菌脂磷壁酸(LTA)的结合能力较强,同时也促进了这两种细菌胞壁组分激活家蚕血淋巴酚氧化酶原,加快胞壁组分介导的家蚕血淋巴黑化反应。加入 BmPGRP-S5 蛋白后,家蚕血细胞对金黄色葡萄球菌的吞噬率提高到 53.33% 左右,对大肠杆菌 $K_{12}D_{31}$ 的吞噬率在 25.83% 左右,对巨大芽孢杆菌的吞噬率达 30.83% 左右,与对照组相比显著增强。【结论】BmPGRP-S5 抑菌作用依赖于 Zn^{2+},可能与其酰胺酶活性有关。BmPGRP-S5 可以通过识别细菌胞壁组分 PGN 或 LTA 在家蚕的黑化反应和细胞吞噬中发挥作用。本研究使用的 BmPGRP-S5 蛋白是通过在果蝇 S2 细胞进行重组表达获得,更能真实地反映其在昆虫体内生理状态下的功能活性。因此,本研究的结果对进一步开发利用 BmPGRP-S5 有指导意义。

关键词: 家蚕; BmPGRP-S5 蛋白; 黑化反应; 细胞吞噬; 抑菌活性

中图分类号: S881　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2020)11-1333-12

Antibacterial activity of BmPGRP-S5 of *Bombyx mori* and its role in cellular immunity

CHEN Xue[1], ZHOU Hong[1], LI Xiao-Feng[1], XIAO Yang[2], ZHONG Yang-Jin[1], YANG Wan-Ying[1,*] (1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Agro-animal Genomics and Molecular Breeding, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Institute of Sericulture and Processing of Agricultural Products, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510610, China)

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(31760638); 广东省自然科学基金自由申请项目(2018A0303130339, 2020A151501867); 广东省蚕桑产业技术体系(2018LM1123)

作者简介: 陈雪, 女, 1994 年 6 月生, 广东茂名人, 硕士研究生, 研究方向为动物遗传学, E-mail: 915202996@qq.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: emilyywy@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2020-03-06; 接受日期 Accepted: 2020-09-03

Abstract:【Aim】Peptidoglycan-recognition proteins (PGRP) can specifically recognize peptidoglycan (PGN) in bacterial cell walls, and trigger the production of antimicrobial peptides through the immune deficiency (IMD) pathway and Toll pathway in insects. This study aims to explore the antibacterial activity of the *Bombyx mori* PGRP-S5 (BmPGRP-S5) and its function in initiating the cellular immunity in *B. mori*.【Methods】BmPGRP-S5 protein was expressed in *Drosophila* embryonic S2 cell line. The antibacterial activities of BmPGRP-S5 protein to *Escherichia coli* $K_{12}D_{31}$, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus megaterium* were assayed based on the bacterial growth curve. The binding ability of BmPGRP-S5 protein to bacterial cell wall components of *E. coli*, *S. aureus* and *Bacillus subtilis* was detected by ELISA. The effect of BmPGRP-S5 on the activation of prophenoloxidase (PPO) by bacterial cell wall components was analyzed by measuring the absorbance value and observing the hemolymph melanization reaction of *B. mori*. The effect of BmPGRP-S5 on the phagocytosis to bacteria by *B. mori* hemocytes was detected by fluorescein isothiocyanate isomer (FITC) labeling method.【Results】The expressed and purified BmPGRP-S5 protein was obtained. BmPGRP-S5 had no antibacterial effect on *S. aureus*, *E. coli* $K_{12}D_{31}$ and *B. megaterium*. However, after adding 40 μmol/L Zn^{2+}, the antibacterial effect of BmPGRP-S5 protein on *B. megaterium* was significantly enhanced. The ELISA results showed that the binding ability of BmPGRP-S5 with PGN from *S. aureus* and lipoteichoic acid (LTA) from *B. subtilis* was strong, which also promoted the activation of phenoloxidase in *B. mori* hemolymph by these two bacterial cell wall components. The melanization reaction of *B. mori* hemolymph mediated by cell wall components was accelerated by BmPGRP-S5. After adding BmPGRP-S5 protein, the phagocytic rates of *B. mori* hemocytes to *S. aureus*, *E. coli* $K_{12}D_{31}$ and *B. megaterium* increased to about 53.33%, 25.83%, and 30.83%, respectively, which were significantly higher than those of the control groups.【Conclusion】The antibacterial activity of BmPGRP-S5 is dependent on Zn^{2+} and may be related to its amidase activity. BmPGRP-S5 can play a role in melanization and phagocytosis in *B. mori* by recognizing bacterial cell wall components PGN or LTA. The BmPGRP-S5 protein used in this study was obtained by the recombinant expression in *Drosophila* S2 cells and can more truly display its functional activity in the physiological state of insects. Therefore, the results are instructive for the further development and utilization of BmPGRP-S5.

Key words: *Bombyx mori*; BmPGRP-S5 protein; melanization reaction; cell phagocytosis; antibacterial activity

肽聚糖识别蛋白(peptidoglycan-recognition proteins, PGRP)是昆虫中非常重要的一类模式识别受体,可以特异性识别细菌细胞壁中的肽聚糖(peptidoglycan, PGN),并通过免疫缺陷(immune deficiency, IMD)途径和 Toll 途径触发抗菌肽的产生(Hultmark, 2003)。第一个 PGRP 是从家蚕 *Bombyx mori* 血淋巴中纯化出来的(Yoshida *et al.*, 1996)。后来陆续有多个 PGRP 家族成员被鉴定,根据5′端非翻译区和转录长度,PGRPs 被分为 S 型 PGRP 和 L 型 PGRP。S 型 PGRP 具有短的转录本和5′端非翻译区,有信号肽,可以被分泌到细胞外,是一类小分子胞外蛋白;L 型 PGRP 具有长的转录本和5′端非翻译区,部分含有跨膜结构域,属于胞内蛋白或跨膜蛋白(Werner *et al.*, 2000; Dziarski, 2004; Royet *et al.*, 2011)。

果蝇 *Drosophila* 基因组中有 13 条 *PGRP* 基因序列,编码 17 个 PGRP 蛋白,通过与 PGN 的识别分别诱导体液免疫和细胞免疫(Dziarski, 2004; Royet *et al.*, 2011)。柞蚕 *Antheraea pernyi* 的 PGRP-SA 可以识别革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌,并参与激活酚氧化酶原(prophenoloxidase, PPO)级联反应(Zhao *et al.*, 2018)。红棕象甲 *Rhynchophorus ferrugineus* 的 PGRP-LB 可通过降解肠道菌群 PGN 来充当粘膜免疫的负调节剂,以防止共生细菌过度生长和非共生细菌持久存活(Dawadi *et al.*, 2018)。2003 年,家蚕全基因组测序完成,通过生物信息学分析发现有 12 条 *PGRP* 基因序列,其中有 6 条 S 型,6 条 L 型。6 条 S 型 BmPGRP, BmPGRP-L2,

BmPGRP-L3 和 BmPGRP-L5 都具有信号肽序列，推测这 9 个蛋白属于分泌型蛋白。BmPGRP-L1，BmPGRP-L4 和 BmPGRP-L6 没有信号肽，属于跨膜蛋白（Tanaka *et al*.，2008）。BmPGRP-S1 是最早鉴定到的 PGRP，参与激活酚氧化酶原级联反应（Yoshida *et al*.，1996）。BmPGRP-S2 参与激活 IMD 途径（Yang *et al*.，2015）。BmPGRP-S3 在家蚕幼虫中肠中有高表达，推测其在家蚕对细胞质多角体病毒（BmCPV）感染的免疫反应中发挥作用（Gao *et al*.，2014）。BmPGRP-S4 可以结合细菌并参与激活 PPO 途径（Yang *et al*.，2017）。Zhang 等（2019）检测了家蚕 5 个 S 型 BmPGRP 基因的转录表达，发现 BmPGRP-S5 能快速响应不同微生物的诱导，而且 BmPGRP-S5 蛋白可以凝集大肠杆菌 *Escherichia coli* 和巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium*，推测其在细胞吞噬中发挥作用。Chen 等（2016）也发现，BmPGRP-S5 蛋白对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌有抑菌活性，并作为启动 PPO 途径的模式识别受体，也可通过酰胺酶依赖性机制控制抗菌肽的产生。

基于家蚕 BmPGRP-S5 蛋白在先天免疫中的作用，以及其良好的抑菌活性，本研究构建家蚕 BmPGRP-S5 重组表达载体并转染至果蝇 S2 细胞，收集分泌表达的蛋白进行纯化。通过 BmPGRP-S5 体外抑菌实验，与不同细菌胞壁组分的结合实验，对黑化反应和血细胞吞噬作用的影响，探究 BmPGRP-S5 蛋白在体外抑菌及家蚕先天免疫中的作用，研究结果将为阐明家蚕细胞免疫发生机制及 BmPGRP-S5 蛋白的开发利用提供参考。

1　材料与方法

1.1　家蚕、菌种、载体与试剂

供试家蚕大造（Dazao）由广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所提供，幼虫期在 26℃ ±2℃，相对湿度 60% ±5%，12 h 日夜交替的环境下用新鲜桑叶饲养。果蝇胚胎 S2 细胞、大肠杆菌 *E. coli* $K_{12}D_{31}$、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、巨大芽孢杆菌 *B. megaterium* 和重组表达载体 pIEx-4-*BmPGRP-S5* 由本实验室保存。

主要试剂：Effectene Transfection Reagent（QiaGen，德国）；大肠杆菌细胞壁组分 PGN-EC 和 LPS-EC、金黄色葡萄球菌胞壁组分 PGN-SA 和 LTA-SA、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 胞壁组分 PGN-BS 和 LTA-BS（InvivoGen，美国）；SFX 昆虫培养基、FITC 荧光标记试剂盒（Sigma-Aldrich，美国）；对硝基苯基磷酸（Thermo Scientific，美国）；SDS、多巴胺、BSA、二乙醇胺（翔博，广州）；BCA 法蛋白定量试剂盒、Anti-His 多克隆抗体、Anti-Mouse HRP 抗体、RIPA（碧云天，上海）；重组烟草天蛾角质层蛋白（cuticle protein 36，CP36）由本实验室保存。

1.2　生物信息学分析

通过 NCBI 数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）搜索家蚕的 PGRP 氨基酸序列、T7 溶菌酶结构域与其他物种的 PGRP 氨基酸序列。将 BmPGRP-S5 氨基酸序列及 T7 溶菌酶结构域输入同源建模网站 SWISS-MODEL（https://swissmodel.expasy.org/interactive）进行建模，模拟输出 BmPGRP-S5 蛋白和 T7 溶菌酶的三维结构。再通过 DNAMAN 软件将家蚕的 PGRP 氨基酸序列、T7 溶菌酶结构域与其他物种的 PGRP 氨基酸序列进行序列比对。

1.3　BmPGRP-S5 蛋白的表达和纯化

将重组表达载体 pIEx-4-*BmPGRP-S5* 和 pCoBlast 质粒共转染 S2 细胞，用 BT 抗生素筛选，获得稳定表达 BmPGRP-S5 蛋白的 S2 细胞。由于表达环境更接近昆虫体内的实际生理环境，BmPGRP-S5 自带信号肽可以将重组表达蛋白引导分泌到 S2 细胞培养液里。大量培养 S2 细胞后收集培养液，通过 Ni-NTA 亲和层析纯化 BmPGRP-S5 蛋白，分别用 Balance Buffer，Elution Buffer A，Elution Buffer B，Elution Buffer C 和 Collection Buffer A 进行洗脱，获得重组表达的 BmPGRP-S5 蛋白，并利用脱盐柱进行脱盐。通过 SDS-PAGE 和 Western blot（一抗为鼠来源的 Anti-His 多克隆抗体，二抗为 Anti-Mouse HRP 抗体）检测外源蛋白表达及纯化效果。

1.4　细菌生长曲线法检测 BmPGRP-S5 重组蛋白的抑菌活性

在 LB 固体培养基上划线培养大肠杆菌 $K_{12}D_{31}$、金黄色葡萄球菌和巨大芽孢杆菌，挑取单菌落于 LB 液体培养基中，37℃ 培养至 OD_{600} = 0.6 ~ 0.8。由于 BmPGRP-S5 蛋白具有保守的依赖于 Zn^{2+} 的酰胺酶活性结构域，本实验拟加入 Zn^{2+} 激活其酰胺酶活性。为排除 Zn^{2+} 本身对测试菌的影响，我们分别用 20，40 和 60 μmol/L 的 Zn^{2+} 处理测试菌，获得不影响细菌生长的 Zn^{2+} 浓度。在最低浓度 Zn^{2+} 工作液中分别加入 BmPGRP-S5 蛋白（Zn^{2+} 组和非 Zn^{2+} 组），使其终浓度为 0.3 mg/mL。将混合液置于 37℃ 摇床上培养，每隔 1 h 测 1 次 A_{590} 吸光值，连续检测 6 h。同时用 PBS 缓冲液和抗生素卡那霉素

(Kanamycin, Kana)分别作为阴性和阳性对照,其中卡那霉素的工作浓度为 50 μg/mL。

1.5　ELISA 检测 BmPGRP-S5 蛋白与不同细菌胞壁组分的结合

金黄色葡萄球菌是革兰氏阳性菌的代表,在细菌性病原微生物中占主要地位(葛志毅等, 2020)。其细胞壁含 90% 的 PGN 和 10% 的磷壁酸(lipoteichoic acid, LTA),LTA 是细菌重要的表面抗原,能黏附于宿主细胞表面;大肠杆菌属革兰氏阴性菌,是人和动物肠道中的常居菌,常被用于昆虫免疫研究(Chen *et al*., 2014; Zhang *et al*., 2018, 2019),其细胞壁主要由 PGN 组成,外面包裹一层脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),能引起哺乳动物强烈的炎症反应,又被称为内毒素;巨大芽孢杆菌属于革兰氏阳性菌,其细胞壁主要组分为 PGN 和 LTA。PGRP 最主要的功能是作为模式识别受体,为进一步研究 BmPGRP-S5 蛋白对病原菌的识别功能,选取高纯度的金黄色葡萄球菌的胞壁组分 PGN-SA 和 LTA-SA、大肠杆菌胞壁组分 PGN-EC 和 LPS-EC 以及枯草芽孢杆菌的胞壁组分 PGN-BS 和 LTA-BS 分别稀释至 40 μg/mL,并分别加到 96 孔板中,置于室温至液体蒸发。底物风干后用 BSA 蛋白进行封闭,分别加入目的蛋白 BmPGRP-S5 和对照蛋白 CP36,浓度均为 20 ng/μL,每孔加 50 μL,同时加入带有 His 标签的鼠抗一抗和山羊抗鼠二抗孵育。最后加入显色剂对硝基苯基磷酸酯,测定 A_{405}吸光值。用 BmPGRP-S5 蛋白组的吸光值减去对照蛋白 CP36 的吸光值后,用 Graphpad Prism 5.0 软件进行统计分析。

1.6　BmPGRP-S5 蛋白激活酚氧化酶原的检测

用解剖针扎 5 龄第 3 天家蚕幼虫倒数第 2 对尾足,收集血淋巴,高速离心去除血细胞,将获得的血浆混匀置于冰上。设 4 组实验,第 1 组加入 30 μL PBS,第 2 组加入 26 μL PBS 和 4 μL BmPGRP-S5 蛋白(0.1 mg/mL),第 3 组加入 22 μL PBS 和浓度为 40 μg/mL 的不同细菌胞壁组分 PGN-EC, LPS-EC, PGN-SA, LTA-SA, PGN-BS 和 LTA-BS 各 8 μL,第 4 组加入 18 μL PBS, 4 μL BmPGRP-S5 蛋白(0.1 mg/mL)和浓度为 40 μg/mL 的不同细菌胞壁组分 PGN-EC, LPS-EC, PGN-SA, LTA-SA, PGN-BS 和 LTA-BS 各 8 μL。然后分别加入 10 μL 的血浆混匀,室温静置 5 min 后离心取 5 μL 上清于 96 孔板中,每孔加入多巴胺(2 mmol/L 多巴胺溶于 50 mmol/L Na_3PO_4, pH6.5)。再用酶标仪测定吸光度 A_{490}值, 1 min测 1 次,连续记录 30 min, PPO 活力以每分钟 A_{490}的变化值表示。

1.7　BmPGRP-S5 蛋白促血淋巴黑化反应的检测

为检测 BmPGRP-S5 蛋白对家蚕血浆黑化反应的影响,将细菌胞壁组分 PGN-SA, LTA-SA, PGN-EC, LPS-EC, PGN-BS 和 LTA-BS 作为激活组分,分别与 BmPGRP-S5 蛋白组合,加入到新鲜的家蚕血淋巴中,激活黑化反应。先在离心管中分别加入 50 μL 浓度为 40 μg/mL 的细菌胞壁组分 PGN-EC, LPS-EC, PGN-SA, LTA-SA, PGN-BS 和 LTA-BS;共有两组,实验组加入 5 μL BmPGRP-S5 蛋白(0.3 mg/mL),对照组加入 5 μL PBS 缓冲液。用解剖针扎家蚕 5 龄第 3 天幼虫倒数第 2 对尾足,收集血淋巴,分别 200 μL 加入到上述混合液中。轻轻混匀,用相机记录下 20 min 内黑化反应的变化,利用 ImageJ 软件对拍下的照片做灰度扫描分析。

1.8　共聚焦显微镜观察 BmPGRP-S5 蛋白对血细胞吞噬细菌的影响

用异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate isomer, FITC)标记大肠杆菌 $K_{12}D_{31}$、金黄色葡萄球菌和巨大芽孢杆菌,方法参考 Pearson 等(2003)的标记方法,将细菌摇至 $OD_{600}=0.6\sim0.8$,离心收集细菌并用 PBS 进行悬浮,加入用二甲基亚枫溶解的 FITC 溶液(10 g/L),使 FITC 在菌液中的终浓度为 5 mg/L,置 37℃ 摇床中反应 1.5 h。收集细菌并用 PBS 洗涤 2 次,用 1% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 洗涤 2 次,配成浓度为 1×10^9 细菌/mL 的悬液,避光保存于 4℃ 备用。

取家蚕血细胞加入到 SFX 培养基中,轻轻摇匀,放置于 28℃ 培养箱 30 min,使血细胞贴壁形成单层细胞。分别加入 200 μL 用 FITC 染料标记的大肠杆菌 $K_{12}D_{31}$、金黄色葡萄球菌和巨大芽孢杆菌($OD_{600}=0.6\sim0.8$)和 100 μL BmPGRP-S5 蛋白(0.3 mg/mL)。空白对照和阴性对照分别选择 100 μL PBS 和细胞松弛素 D(cytochalasin D, CytD)。接着在 28℃ 避光培养 3 h。洗净培养基,用 0.05% 的 Trypan Blue 猝灭未被血细胞吞噬的细菌细胞所带荧光,洗净多余的 Trypan Blue。用 4% 多聚甲醛固定 30~60 min,洗净多余的多聚甲醛,封片。在共聚焦显微镜(FV10-ASW, Olympus, 日本)的 100× 油镜下进行观察,分别统计 5 个视野区域 600 个血细胞中被吞噬的细菌的数量,吞噬率指被吞噬细菌的占比(Qi *et al*., 2016)。

1.9　数据分析

实验数据以 3 次重复的平均值 ± 标准误表示,

用 Graphpad Prism 5.0 软件进行作图，两组间的差异显著性采用 t 检验进行检验。

2　结果

2.1　BmPGRP-S5 蛋白的序列分析

对 BmPGRP-S5 蛋白进行结构分析发现，BmPGRP-S5 蛋白的 PGRP 结构域与 T7 溶菌酶的酰胺酶结构域具有相似性(图 1)，暗示 BmPGRP-S5 蛋白具有溶菌酶的活性。由于 T7 溶菌酶酰胺酶活性由依赖于 Zn^{2+} 的 His(H)，Tyr(Y)，His(H)，Thr(T)和 Cys(C)决定(Yang *et al.*, 2017；Wang *et al.*, 2020)，因此进一步对 BmPGRP-S5 蛋白、T7 溶菌酶和其他物种的 PGRP 进行氨基酸比对，结果如图 2 所示，BmPGRP-S5 蛋白在这几个酰胺酶活性的关键位点上完全保守，推测 BmPGRP-S5 蛋白可能也有依赖 Zn^{2+} 的酰胺酶活性。

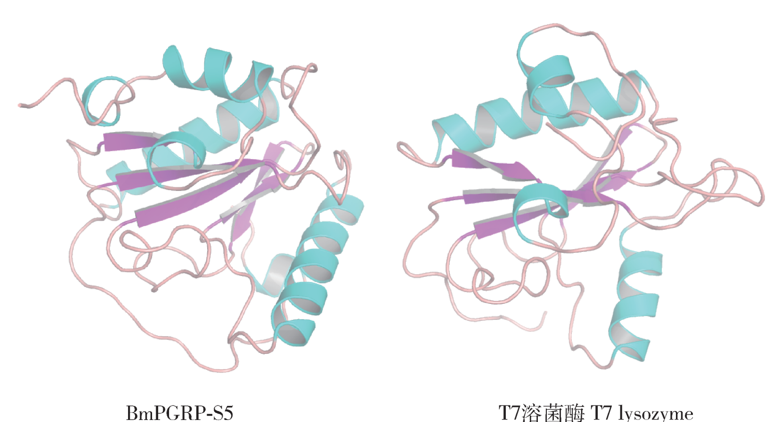


图 1　家蚕 BmPGRP-S5 蛋白与 T7 溶菌酶的结构域对比

Fig. 1　Comparison of domains of BmPGRP-S5 protein of *Bombyx mori* and T7 lysozyme

```
T7-LYS               ..............................................................MARVQFKQRE.STDAIFVHCS......ATKPSQNVGVREIRQWHK.EQGWLD
BMPGRP-S2            .......MLVAPSLLLLVFLVSFGTLNA.............ASECGEIPITEWS..GTESRRKQPLKS.PIDLVVIQHTVSND.CFTDEECLLSVNSLRQHHMRLAGFKD
BMPGRP_PRECURSOR     ........MAVRLLFITISLISAVTALP.....SPIKLVS.DYSFPFVSREEWG..ARPPTMTSPLKVSPVPIVVIHHSYIPKICLVRADCERDLRNMQRVHQVTNGWED
BMPGRP-S6_PRECURSOR  .........MFLSFCIFIVFCAYTSSHP.....RLIEKDHLSVDFPVCSRDCWG..AVPSKDTRPLNK.PVPYVIIHHTAIPTVCNTTTQCMRDMRSMQKYHN.SLGWGD
BMPGRP-LB            ..........MIALLILFGIISSSIGYPSVDKADPSTNDVTTYDFRYVTRAEWQ..AKTPVQTTPLKT.PVPYVVIHHTYIPGACHTREQCSSAMRGMQNYSMIDNNWWD
DMPGRP-LB            ..................MQQANLGDG.............VATARLLSRSDWG..ARLPKSVEHFQG.PAPYVIIHHSYMPAVCYSTPDCMKSMRDMQDFHQLERGWND
DMPGRP-SB1           .......MNTSTAISFVAALVLCCLALS.............ANALQIEPRSSWG..AVSARSPSRISG.AVDYVIIHHSDNPNGCSTSEQCKRMIKNIQSDHKGRRNFSD
DMPGRP-SB2           .............MKLQLALVLCGLTLA.............LG..QIVPRSSWCPVPISPRMP.RLMV.PVRLIIIHHTVTAP.CFNPHQCQLVLRQIRADHM.RRKFRD
DMPGRP-SC1A          .........MVSKVALLLAVLVCSQY.M.............AQGVYVVSKAEWG..GRGAKWTVGLGN.YLSYAIIHHTAGSY.CETRAQCNAVLQSVQNYHMDSLGWPD
DMPGRP-SC2           .........MANKALILLAVLFCAQ..A.............VLGVTIISKSEWG..GRSATSKTSLAN.YLSYAVIHHTAGNY.CSTKAACITQLQNIQAYHMDSLGWAD
GMPGRP-LB            .........MTAFGFVLLSMWGWMNETT.............PLHSRIIARSEWG..ARDPILVEKFIG.PSAFVIVHHSYTPEACYTTDDCKKAMRSMQDFHQLERGWND
HAPGRP-B             ........MASLLYIVFACVLATIAAHP.....SPTGKSYYSYPFNYVSRDTWG..ARPPNGVTPLNL.PVPYVVVHHSYIPPLCHTQDQCKRDMRAMQDVHQLVNGWQD
HAPGRP-C             .........MAFKLLVSAVFASLLSAHA.....SPLALKSIERSFPFYSKEEWG..AEVPTDVRPLHH.PAPYVVIHHTYIPSACDSREDCSAKMRSMQRYHN.SLGWGD
HDPGRP-1             MKLATITFFLLTEIFFYISYAEATRSGP.............DLCPTIISKRDWG..GNAALRVGYTSK.PLERVVIHHTVTPE.CANEARCSSRMVSMQNYHMDELGYDD
MSPGRP-2             ........MASFALIVILSVIGFISAYP.....SPEGYSS.AFNFPFVTKEQWG..GREARTSTPLNH.PVQFVVIHHSYIPGVCLSRDECARSMRSMQNFHMNSNGWSD
SRPGRP-A             .......MNMLLCFVYILFIVNFAKVN...............ADCGIVSKDDWD..GLTPVHVEYLNR.PVKLVIIQHTDTPQ.CLTNDACAARVRSIQDYHMDTLKYWD
SRPGRP-B             ........MVKYVLIAIITLAGCVLSYP.....NPRSSAY.SYAFPFVNKEQWG..GRPSTGGSRLNS.PVLYVVIHHTYIPGVCMTRVECSNAMRSMQNVHQLTNGWSD
Consensus                                                                                                                            d
                                                                                                     H

T7-LYS               VGYHFIIKRDGTVEAGRDEMAVGSHAKGYNHNSIGVCLVGGIDDKGKFDANFTPAQMQSLRSLLVTLLAKYEGAVLRAHHEVAPKACPS...FDLKRWEKNELVTSDRG
BMPGRP-S2            LGYSFVAGGNGKIYEGAGWNHIGAHTLHYNNISIGIGFIG..DFREKLPTQQALQAVQDFLACGVENNLLTEDYHVVGHQQLINTLSPGAVLQSEIESWPHWLDNARKVL
BMPGRP_PRECURSOR     IGYSFAVGGEGTVFEGRGWSSIGAHAFGVNTRSIGILLIG..DFITNQPPQAQLQSVKDLIEAGVRLGHIRSDYKLIGHRQVTPTECPGQRLFDEISKWDHFSLNWDD..
BMPGRP-S6_PRECURSOR  IGYHFCVGGDGVAYEGRGWNVIGIHAGPANKLSIGICLIG..DWRVETPPAEQLATTKKLLSTGVEMGAISSDYKLIGHNQAMTTECPGGALLEEISTWDNYHPGHVNFR
BMPGRP-LB            IGYNFAVGGDG.VYEGRGWTDRGAHSLHFNNISIGISFIG..DYRFTVPSVEQIAAAKSLIATGVELGFVKPAHKIIGHRQVRRTACPGDALYELIKTWDKYSPFPGSID
DMPGRP-LB            IGYSFGIGGDGMIYTGRGFNVIGAHAPKYNDKSVGIVLIG..DWRTELPPKQMLDAAKNLIAFGVFKGYIDPAYKLLGHRQVRDTECPGGRLFAEISSWPHFTHINDTEG
DMPGRP-SB1           IGYNFIVAGDGKVYEGRGFGLQGSHSPNYNRKSIGIVFIG..NFERSAPSAQMLQNAKDLIELAKQRGYLKDNYTLFGHRQTKATSCPGDALYNEIKTWPHWRQN.....
DMPGRP-SB2           IGYNFLIGGDGRIYEGLGFGIRGEHAPRYNSQSIGIAFIG..NFQTGLPPSQMLQAARTLIQIAVQRRQVSPNYSVVGHCQTKATACPGIHLLNELKKWPNWRPKP....
DMPGRP-SC1A          IGYNFLIGGDGNVYEGRGWNNMGAHAAEWNPYSIGISFLG..NYNWDTLEPNMISAAQQLLNDAVNRGQLSSGYILYGHRQVSATECPGTHIWNEIRGWSHWSG......
DMPGRP-SC2           IGYNFLIGGDGNVYEGRGWNVMGAHATNWNSKSIGISFLG..NYNTNTLTSAQITAAKGLLSDAVSRGQIVSGYILYGHRQVGSTECPGTNIWNEIRTWSNWKA......
GMPGRP-LB            IGYSFGIGGDGNIYVGRGFNVIGAHAPKYNDKSVGICLIG..DWRNDLPTDKMLQATRDLIAFGLSQGYIHRQYQLLGHRQVRATECPGDRLYKEITKWPHFSPVPNNNN
HAPGRP-B             IGYNFAVGGEGSVYEGRGWDVVGAHAVSYNVKSIGICMIG..DFVENLPPAAQIQSLRELIEAGVQLGYISPDYKLIGHRQVSATECPGQALFNEISTWDHFTPEL....
HAPGRP-C             IGYHFCVGGDGAAYEGRGWDTVGIHATVANSHSIGICLIG..DWRVELPPVEQLETTKALIEEGVIRGKISPDYKLIAHNQVSATECPGDALVAEFSTWPHYTPGRPDFS
HDPGRP-1             ISYNFVIGGDGRVYEGVGWHKKGSHSPGWDSQSIGIAFIG..DFTNKLPSREMLDAAKDLIVCAIELGELTRGYKLLGARNVKATKSPGDKLYREIQNWEGFTRRP....
MSPGRP-2             IGYNFAVGGEGSVYEGRGWDAVGAHAAGYNSNSIGIVLIG..DFVSNLPPAVQMQTTQELIAAGVRLGYIRPNYMLIGHRQVSATECPGTRLFNEITNWNNFVRI.....
SRPGRP-A             IGSAFLIGGNAKVYEGSGWVHVSVPTHAYNRKALRITVIG..NYNSHQPTAEQIDALKSLLRCGVNNGHLDSDYNVVGHRQLMATDSPGRKLYNIIRRWPEWLENVDSYK
SRPGRP-B             IGYNFAVGGEGSVYEGRGWTTVGAHAVGFNTNSIGIVLIG..DWISNLPPARQLQTTKDLIAAGVKLGYIRPDYLLIGHRQASATECPGERLFREISTWEQFTSTV....
Consensus                                   g                                                    p        w
                         Y                                                       H    T C
```

图 2　家蚕 BmPGRP-S5 蛋白与 T7 溶菌酶和其他昆虫 PGRP 蛋白的序列比对

Fig. 2　Sequence alignment of BmPGRP-S5 protein of *Bombyx mori* and T7 lysozyme and other insect PGRP proteins

蛋白来源物种和 GenBank 登录号 Origin species of proteins and their GenBank accession numbers：T7-LYS：T7 溶菌酶 T7 lysozyme (NP_041973.1)；BMPGRP-S2：家蚕 *Bombyx mori* (NP_001037560.1)；BMPGRP_PRECURSOR：家蚕 *Bombyx mori* (NP_001243949.1)；BMPGRP-S6_PRECURSOR (BmPGRP-S5)：家蚕 *Bombyx mori* (NP_001036858.1)；BMPGRP-LB：家蚕 *Bombyx mori* (XP_012548099.1)；DMPGRP-LB：黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (NP_001247054.1)；DMPGRP-SB1：黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (NP_648917.1)；DMPGRP-SB2：黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (NP_648916.1)；DMPGRP-SC1A：黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (NP_610407.1)；DMPGRP-SC2：黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (NP_610410.1)；GMPGRP-LB：刺舌蝇 *Glossina morsitans* (ABC25064.1)；HAPGRP-B：棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (AFP23116.1)；HAPGRP-C：棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (AFP23117.1)；HDPGRP-1：蛴螬 *Holotrichia diomphalia* (AB115774)；MSPGRP-2：烟草天蛾 *Manduca sexta* (ACX49764.1)；SRPGRP-A：印度蚕 *Samia ricini* (BAF03522)；SRPGRP-B：印度蚕 *Samia ricini* (BAF03520.1).

2.2 BmPGRP-S5 蛋白的表达与纯化

将 *BmPGRP-S5* 基因重组到 pIEx-4 载体上，转染果蝇 S2 细胞。通过 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测发现 BmPGRP-S5 蛋白表达后可以被自身信号肽引导分泌到细胞培养液里（图 3：A，B）。收集培养液，通过 Ni-NTA 亲和层析柱进行蛋白纯化，洗脱液 Collection Buffer A 可把目的蛋白 BmPGRP-S5 蛋白高效单一地纯化出来（图 3：A，B）。

2.3 BmPGRP-S5 蛋白的抑菌活性

溶菌酶的酰胺酶活性依赖于 Zn^{2+}，我们先在缓冲液里添加 Zn^{2+}，发现金黄色葡萄球菌对 Zn^{2+} 非常敏感，浓度为 20 μmol/L 的 Zn^{2+} 就能抑制细菌生长（图 4：A），故对金黄色葡萄球菌进行的后续抑菌实验中不添加 Zn^{2+}。终浓度为 20 和 40 μmol/L 的 Zn^{2+} 分别对大肠杆菌 $K_{12}D_{31}$（图 4：B）和巨大芽孢杆菌（图 4：C）的生长活力无影响，因此后续实验中分别添加 20 和 40 μmol/L 的 Zn^{2+} 进行抑菌实验。BmPGRP-S5 蛋白的抑菌效果如图 4（B）所示，没有添加 Zn^{2+} 的 BmPGRP-S5 蛋白对测试菌金黄色葡萄球菌（图 4：D）、大肠杆菌 $K_{12}D_{31}$（图 4：E）和巨大芽孢杆菌（图 4：F）的生长均无影响。在加入 40 μmol/L 的 Zn^{2+} 后，BmPGRP-S5 蛋白对巨大芽孢杆菌的抑菌效果有明显增强（$P<0.05$）；但是加入 20 μmol/L 的 Zn^{2+} 后 BmPGRP-S5 蛋白并不能抑制大肠杆菌 $K_{12}D_{31}$ 的生长，说明 BmPGRP-S5 蛋白的抑菌效果微弱，在添加 Zn^{2+} 的情况下仅对巨大芽孢杆菌有抑菌效果，同时也暗示这种抑菌作用依赖于 Zn^{2+}，是通过含有锌指结构域的酰胺酶活性功能域发挥作用。

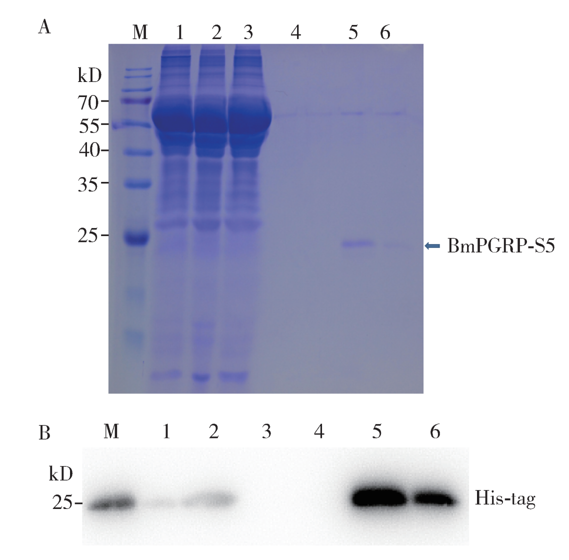


图 3 家蚕 BmPGRP-S5 蛋白的表达及纯化的 SDS-PAGE（A）和 Western blot（B）检测

Fig. 3 Expression and purification of BmPGRP-S5 protein of *Bombyx mori* detected by SDS-PAGE (A) and Western blot (B)

M：蛋白分子量标准 Protein molecular weight marker；1：S2 细胞培养液 S2 Cell Culture Medium；2：Elution Buffer A；3：Elution Buffer B；4：Elution Buffer C；5：Collection Buffer A；6：Collection Buffer A 脱盐超滤 Desalted Collection Buffer A by ultrafiltration.

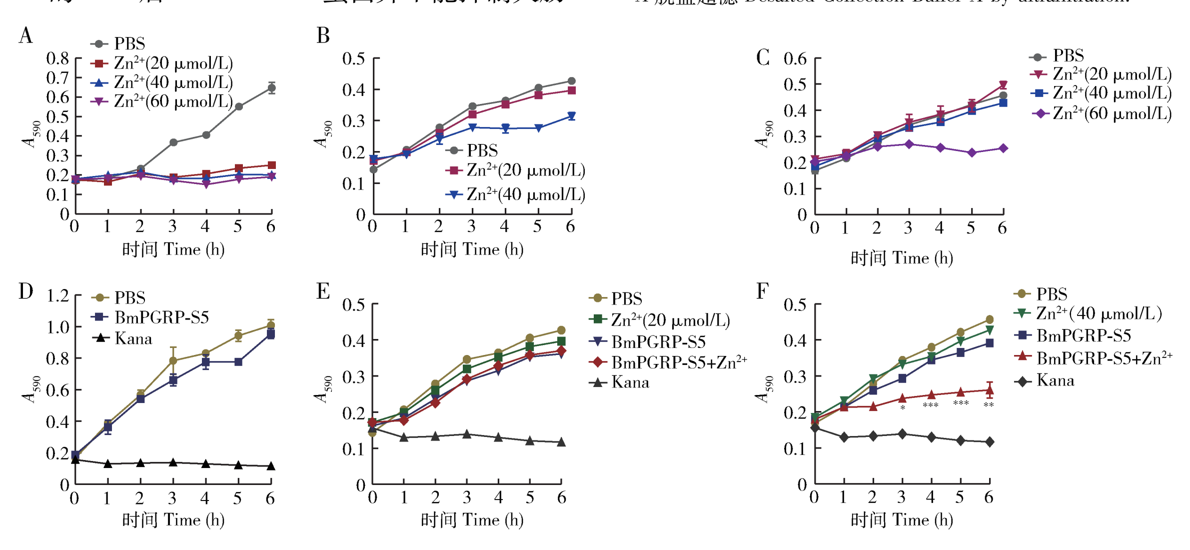


图 4 家蚕 BmPGRP-S5 蛋白对细菌生长曲线的影响

Fig. 4 Effect of BmPGRP-S5 protein of *Bombyx mori* on the growth curves of bacteria

A，D：金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*；B，E：大肠杆菌 *Escherichia coli* $K_{12}D_{31}$；C，F：巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium*. A，B，C：Zn^{2+} 浓度对供试菌生长曲线的影响 Effect of Zn^{2+} concentration on the growth curve of the tested bacteria；D，E，F：家蚕 BmPGRP-S5 蛋白对供试菌的抑菌活性 Antibacterial activity of BmPGRP-S5 protein against the tested bacteria. PBS：阴性对照 Negative control；Kana：卡那霉素（50 μg/mL，阳性对照）Kanamycin (50 μg/mL, positive control). 图中数据为 3 次重复的平均值 ± 标准误；星号表示 BmPGRP-S5 和 BmPGRP-S5 + Zn^{2+} 组间差异显著（$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$，*t* 检验）。Data in the figure are mean ± *SE* of three replicates, and asterisks indicate significant differences between the BmPGRP-S5 group and the BmPGRP-S5 + Zn^{2+} group ($^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, *t*-test).

2.4　BmPGRP-S5 蛋白与不同细菌胞壁组分的结合

我们通过 ELISA 实验检测了 BmPGRP-S5 蛋白与细菌胞壁组分的结合能力,实验结果如图 5 所示。BmPGRP-S5 蛋白与金黄色葡萄球菌的胞壁组分 PGN 和枯草芽孢杆菌胞壁组分 LTA 的结合力较强。而 BmPGRP-S5 蛋白与金黄色葡萄球菌的 LTA-SA、大肠杆菌的 PGN-EC 和 LPS-EC 及枯草芽孢杆菌的 PGN-BS 结合能力微弱。

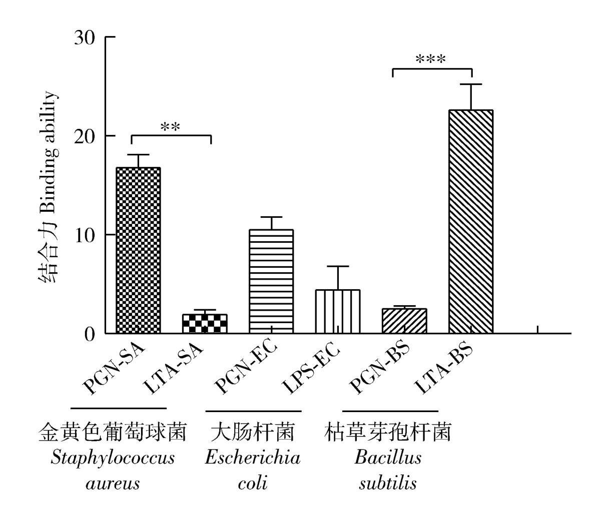


图 5　家蚕 BmPGRP-S5 蛋白与细菌胞壁组分的结合力
Fig. 5　Binding ability of BmPGRP-S5 protein of *Bombyx mori* to bacterial cell wall components

PGN-SA, LTA-SA：金黄色葡萄球菌的胞壁组分 Cell wall components of *Staphylococcus aureus*；PGN-EC, LPS-EC：大肠杆菌的胞壁组分 Cell wall components of *Escherichia coli*；PGN-BS, LTA-BS：枯草芽孢杆菌的胞壁组分 Cell wall components of *Bacillus subtilis*；PGN：肽聚糖 Peptidoglycan；LTA：脂磷壁酸 Lipoteichoic acid；LPS：脂多糖 Lipopolysaccharide. 下同 The same below. BmPGRP-S5 蛋白与不同的细菌胞壁组分的结合力为 BmPGRP-S5 蛋白总的吸光值减去对照蛋白 CP36 总的吸光值。图中数据为 3 次重复的平均值 ± 标准误；星号表示两组间差异显著（* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, t 检验）。The binding ability of BmPGRP-S5 protein to different microbial cell wall components was obtained by total absorbance of BmPGRP-S5 protein subtracting the total absorbance of the control protein CP36. Data in the figure are mean ± *SE* of three replicates, and asterisks indicate significant differences between two groups (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, t-test).

2.5　BmPGRP-S5 蛋白参与酚氧化酶原反应

酚氧化酶原介导的黑化是一种重要的昆虫免疫反应,为研究 BmPGRP-S5 蛋白是否参与黑化反应,我们检测了 BmPGRP-S5 蛋白对不同细菌胞壁组分促进酚氧化酶原反应中的作用(图 6)。结果显示体外表达的 BmPGRP-S5 蛋白以及各细菌胞壁组分 PGN, LTA 和 LPS 都可以激活酚氧化酶原级联系统。而 BmPGRP-S5 蛋白可以促进金黄色葡萄球菌的 PGN-SA 和枯草芽孢杆菌的 LTA-BS 激活酚氧化酶原系统的能力。这与 ELISA 检测到 BmPGRP-S5 蛋白与金黄色葡萄球菌的 PGN-SA 和枯草芽孢杆菌的 LTA-BS 结合能力强的结果(图 5)相一致。但是结果也显示加入 BmPGRP-S5 蛋白会抑制 LTA-SA, LPS-EC 和 PGN-BS 的促酚氧化酶原能力。

2.6　BmPGRP-S5 蛋白在细菌胞壁组分激活下对黑化反应的影响

为检测 BmPGRP-S5 蛋白对家蚕血浆黑化反应的影响,将 3 种细菌胞壁组分分别与 BmPGRP-S5 蛋白组合,加入到新鲜的家蚕血淋巴中,激活的黑化反应如图 7(A)所示。金黄色葡萄球菌的 PGN-SA 和 LTA-SA 本身就可以明显激发黑化反应,在 20 min 内,BmPGRP-S5 对 PGN-SA 处理组有促进作用,但对 LTA-SA 处理组呈现抑制作用;来自大肠杆菌的 PGN-EC 和 LPS-EC 对黑化反应的激发作用微弱,BmPGRP-S5 蛋白在后期对 PGN-EC 处理组有促进作用,对 LPS-EC 处理组有抑制作用;枯草芽孢杆菌的 PGN-BS 和 LTA-BS 本身对黑化的激活效果不明显,但在 LTA-BS 组加入 BmPGRP-S5 蛋白后 5 min 出现黑化反应,10 min 后明显增强。图 7(B)是对图 7(A)的灰度扫描,从统计数据可以看出,当 BmPGRP-S5 蛋白与枯草芽孢杆菌的 LTA-BS 同时存在时,可以加快 LTA-BS 对酚氧化酶原的激活速度,且黑化程度也更强;而 BmPGRP-S5 蛋白对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌促进黑化反应的功能不显著。

2.7　BmPGRP-S5 蛋白对家蚕血细胞吞噬细菌作用的影响

共聚焦显微镜观察发现,细胞松弛素 D(Cyt D)处理血细胞后会影响细胞骨架的动力,降低细胞能动性和吞噬能力。PBS 缓冲液组的血细胞有一定的吞噬能力,但在加入 BmPGRP-S5 蛋白后能明显促进血细胞对大肠杆菌 $K_{12}D_{31}$、金黄色葡萄球菌和巨大芽孢杆菌的吞噬能力(图 8：A)。在显微镜下选择不同的视野进行计数,并计算细胞吞噬效率。用 CytD 处理后,血细胞对 3 种供试菌的吞噬率都在 10% 左右,PBS 缓冲液中血细胞的吞噬率在 30% 以下,互相之间没有明显差异。加入 BmPGRP-S5 蛋白后,血细胞对金黄色葡萄球菌的吞噬率提高到 53.33% 左右,对大肠杆菌 $K_{12}D_{31}$ 的吞噬率在 25.83% 左右,对巨大芽孢杆菌的吞噬率达 30.83% 左右。与对照组相比,BmPGRP-S5 蛋白对血细胞吞噬金黄色葡萄球菌有明显的促进作用;对吞噬大肠杆菌 $K_{12}D_{31}$ 和巨大芽孢杆菌也有促进作用(图 8：B)。

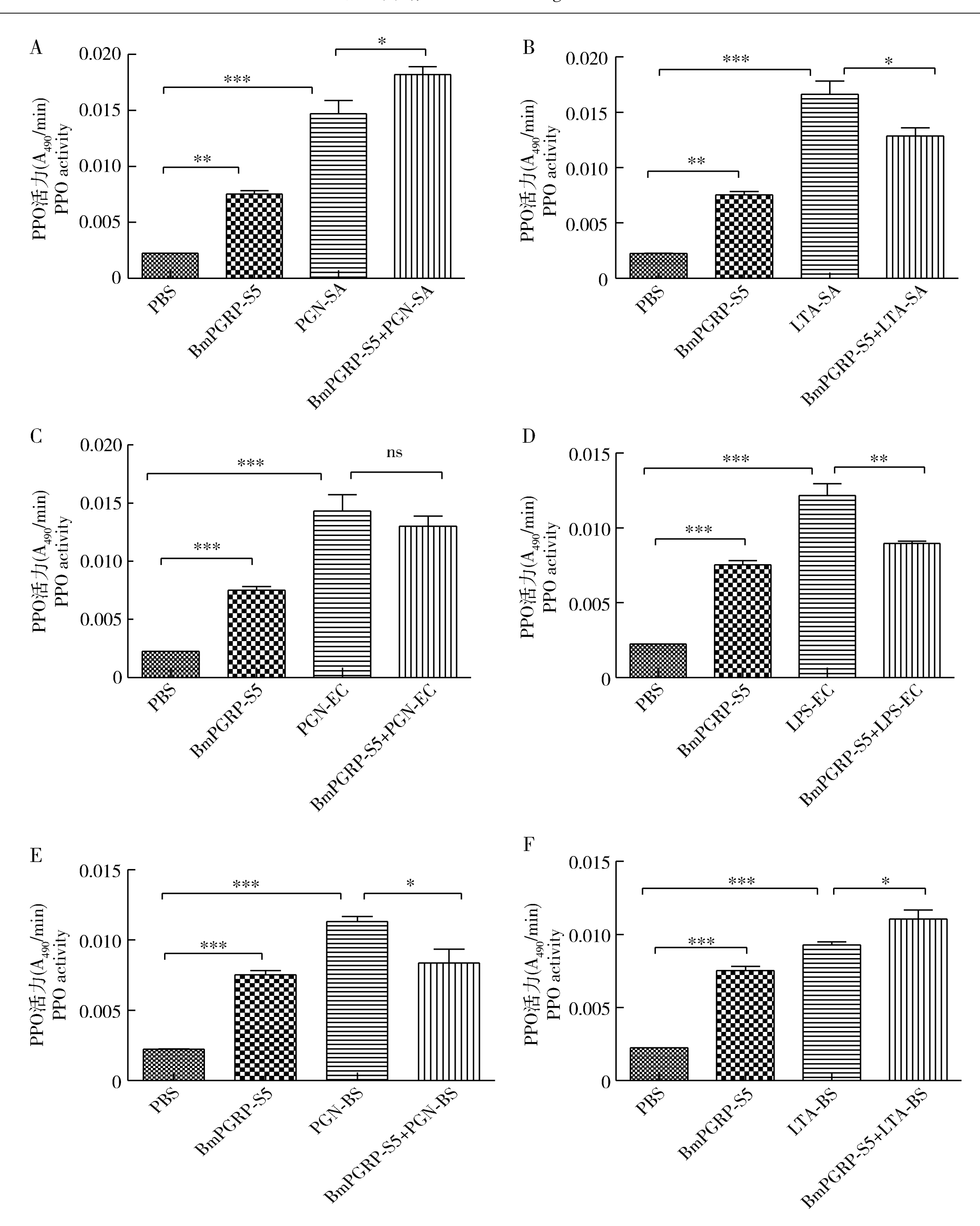


图 6 BmPGRP-S5 蛋白对不同细菌胞壁组分激活家蚕第 3 天幼虫血淋巴中酚氧化酶原(PPO)的影响

Fig. 6 Effect of BmPGRP-S5 protein on the activation of prophenoloxidase (PPO) in the haemolymph of the day-3 5th instar larvae of *Bombyx mori* by different bacterial cell wall components

图中数据为 3 次重复的平均值 ± 标准误;星号表示两组间差异显著(* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, *t* 检验)。Data in the figure are mean ± *SE* of three replicates, and asterisks indicate significant differences between two groups (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, *t*-test).

3 讨论

PGRP 作为细菌胞壁组分肽聚糖的模式识别受体,生物信息学分析发现 PGRP 具有典型的依赖 Zn^{2+} 的酰胺酶活性域,第 61 位的 His(H)、第 91 位的 Tyr(Y)、第 171 位的 His(H)、第 177 位的 Thr(T)和第 179 位的 Cys(C)是酶促活性的关键位点(Yang *et al*., 2017; Wang *et al*., 2020)。Chen 等(2014)研究发现,BmPGRP-S5 蛋白对革兰氏阳性菌藤黄微球菌 *Micrococcus luteus*、金黄色葡萄球菌和革兰氏阴性菌粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescens*、大肠

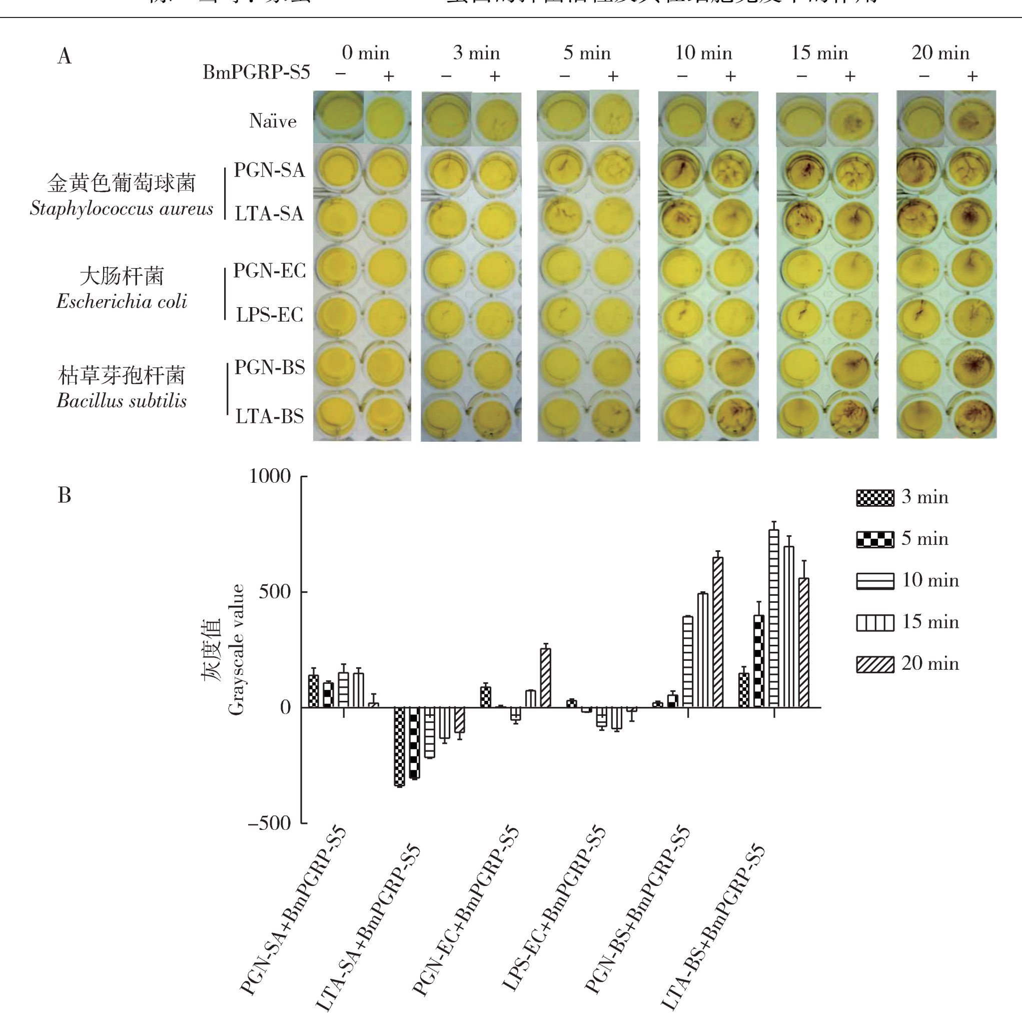


图 7　BmPGRP-S5 蛋白对家蚕 5 龄第 3 天幼虫血淋巴黑化反应的影响(A)及灰度扫描分析(B)

Fig. 7　Effect of BmPGRP-S5 protein on melanization reaction in hemolymph of the day-3 5th instar larvae of *Bombyx mori* (A) and grayscale scan analysis (B)

−：没有添加 BmPGRP-S5 蛋白 BmPGRP-S5 protein was not added；+：添加了 BmPGRP-S5 蛋白 BmPGRP-S5 protein was added；Naïve：自然状态 Natural status. 图中数据为 3 次重复的平均值 ± 标准误。Data in the figure are mean ± *SE* of three replicates.

杆菌 JM109 都有抑菌活性，但 Zn^{2+} 并没有增加 BmPGRP-S5 的酰胺酶活性。对 BmPGRP-S4 的实验也表明，额外向缓冲液里添加 Zn^{2+} 并不能提升其抗菌活性(Yang *et al*., 2017)，似乎说明 PGRP 的抑菌活性不取决于酰胺酶活性结构域。而在本研究的检测中，BmPGRP-S5 蛋白本身对 3 种供试菌均没有抑菌活性，只有加入 40 μmol/L 的 Zn^{2+} 后对巨大芽孢杆菌有抑菌活性，暗示 BmPGRP-S5 蛋白对细菌的抑菌作用与酰胺酶活性有关(图 4)。与前者结果不同的原因猜测可能是原核系统表达的 PGRP 蛋白溶剂中已有足够的 Zn^{2+}，额外添加 Zn^{2+} 无法发挥作用(Yang *et al*., 2017)。虽然 BmPGRP-S5 蛋白对巨大芽孢杆菌有抑菌作用，但抑菌活性不强，也不广谱，直接作为抑菌剂的开发意义不大。

过去的研究认为 PGRP 最主要的功能是对 PGN 的识别，近年来有新进展。Li 等(2013)发现草鱼 *Ctenopharyngodon idellus* 中的 PGRP5 在 CIK 细胞中的表达可以被 PGN 和 LTA 所诱导。来自单峰骆驼 *Camelus dromedarius* 的 CPGRP-S 可以与 LPS 及 LTA 结合，从而抑制 LPS 和 LTA 诱导的细胞炎症因子 TNF-和 IL-6 的表达，并且 CPGRP-S 可以显著降低 LPS 和 LTA 诱导的死亡率(Sharma *et al*., 2011)。Sharma 等(2013)进行的生物信息学分析发现，CPGRP-S 能分别与 LPS, PGN 和 LTA 在 C－D 接触位点相结合。除 CPGRP-S 外，骆驼科的肽聚糖识别蛋白-1(peptidoglycan recognition protein-1, PGLYRP-1)可以在体外与 LPS 和 LTA 紧密结合，从而抑制 LPS 和 LTA 诱导细胞炎性因子 TNF-α 和 IL-6 表达(Zhang *et al*., 2012)。因此，Dziarski 和 Gupta (2018)提出，哺乳动物 PGRP 的其他结合位点位于

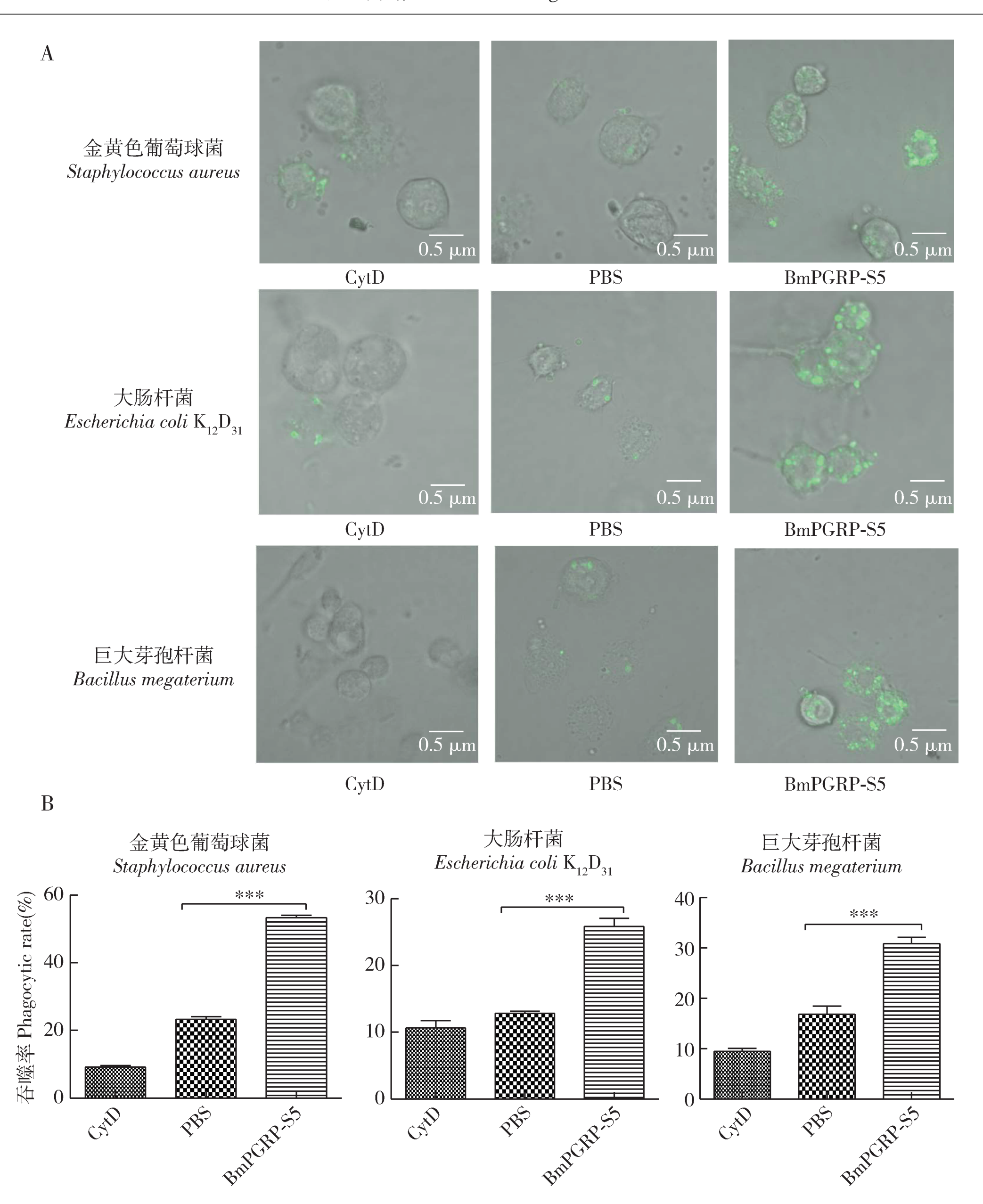


图 8 BmPGRP-S5 蛋白对家蚕血细胞吞噬细菌的能力(A)及吞噬率(B)的影响

Fig. 8 Effect of BmPGRP-S5 protein on the phagocytosis of bacteria by hemocytes (A) and phagocytic rate (B) in *Bombyx mori*

用异硫氰酸荧光素(FITC)标记大肠杆菌 $K_{12}D_{31}$、金黄色葡萄球菌和巨大芽孢杆菌,在共聚焦显微镜的油镜(100×)下进行观察,分别统计 5 个视野区域 600 个血细胞中吞噬细菌的数量,吞噬率为被吞噬的细菌的数量占比。*E. coli* $K_{12}D_{31}$, *S. aureus* and *B. megaterium* were labeled by fluorescein isothiocyanate isomer (FITC), observed under oil lens (100×) of confocal microscope, and the number of phagocytosed bacteria in 600 hemocytes in five visual fields was counted. Phagocytic rate refers to the proportion of bacteria phagocytosed by hemocytes. CytD: 细胞松弛素 D(阴性对照)Cytochalasin D (negative control); PBS: 空白对照 Blank control.

肽聚糖结合沟之外,能与 LPS 和 LTA 等具特异结合性。我们的研究发现,BmPGRP-S5 蛋白除了与金黄色葡萄球菌胞壁组分 PGN 结合外,还可以与来自枯草芽孢杆菌的胞壁胞壁组分 LTA 结合(图 5)。结果表明不止鱼类和哺乳动物中的 PGRP 可以通过识别 LPS 和 LTA 来参与天然免疫,昆虫中的 PGRP 也可以识别 LTA。

黑化反应和细胞吞噬是昆虫最主要的快速免疫方式。果蝇细胞免疫包括黑化、细胞吞噬、凝集和结节等能在 30 min 内清除 99.5% 的细菌,Toll 和 IMD 介导的体液免疫只负责清除细胞免疫后剩余的微量细菌(Haine *et al.*, 2008)。我们取家蚕血淋巴和血

细胞分别进行黑化反应和细胞吞噬实验，当体系中加入 BmPGRP-S5 蛋白时，可以加快对酚氧化酶原的激活速度，提高血细胞的吞噬效率。本实验与 Chen 等(2014)的研究结果有不同，其在与细菌细胞壁组分的结合实验中，BmPGRP-S5 蛋白与来自大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的 PGN 结合力较强，与来自金黄色葡萄球菌的 PGN 结合力较弱；在检测酚氧化酶原活力的实验中，家蚕中的 BmPGRP-S5 蛋白与来自大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的 PGN 结合均可以激活酚氧化酶原系统。但在本研究的结合实验中，BmPGRP-S5 蛋白与来自金黄色葡萄球菌的 Lys 型 PGN 结合力较强，与来自大肠杆菌的 DAP 型 PGN 和枯草芽孢杆菌的 PGN-BS 结合能力非常弱；在检测酚氧化酶原活力的实验中，BmPGRP-S5 蛋白可以促进金黄色葡萄球菌的 PGN-SA 激活酚氧化酶原系统，但无法促进来自于大肠杆菌和巨大芽孢杆菌的 PGN 来激活酚氧化酶原系统(图 6)。出现不同结果的可能原因是 Chen 等(2014)实验中的 BmPGRP-S5 是用大肠杆菌原核表达纯化出来，经过了变性、复性等过程，我们的 BmPGRP-S5 蛋白是在果蝇 S2 细胞真核表达，可以利用自身信号肽分泌到细胞外，蛋白活性不受影响，更趋近昆虫体内的生理生化环境。本研究发现，BmPGRP-S5 蛋白抑制了 LTA-SA 和 LPS-EC 引起的家蚕血淋巴黑化反应(图 7)，BmPGRP-S5 与这 2 个细菌胞壁组分结合后会抑制 PPO 的活性(图 6)，暗示 BmPGRP-S5 蛋白可能对某些细菌胞壁组分引发的免疫通路有负控制作用，其具体机理尚不清楚，有待进一步研究。

本研究的 BmPGRP-S5 蛋白是在果蝇 S2 细胞中重组表达的，它可以利用自身信号肽分泌到细胞外，蛋白活性不受影响，更能真实地反映 BmPGRP-S5 蛋白的功能特性。而且本研究更注重研究 BmPGRP-S5 蛋白与不同细菌胞壁组分结合后对细胞免疫的影响。本研究的结果表明，BmPGRP-S5 蛋白可以通过识别革兰氏阳性菌的 PGN 和 LTA 激活血淋巴黑化反应，并促进家蚕血细胞吞噬外源微生物。接下来，我们会进一步通过 Pull-down 来寻找与 BmPGRP-S5 互作的蛋白，研究促进黑化和细胞吞噬的下游因子。本研究结果将有助于阐明家蚕血细胞对外源微生物吞噬的识别机制，也为进一步研究昆虫细胞免疫奠定基础。

参考文献（References）

Chen K, Liu C, He Y, Jiang H, Lu Z, 2014. A short-type peptidoglycan recognition protein from the silkworm: expression, characterization and involvement in the prophenoloxidase activation pathway. *Dev. Comp. Immunol.*, 45(1): 1 – 9.

Chen KK, Zhou L, Chen F, Peng YC, Lu ZQ, 2016. Peptidoglycan recognition protein-S5 functions as a negative regulator of the antimicrobial peptide pathway in the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev. Comp. Immunol.*, 61: 126 – 135.

Dawadi B, Wang X, Xiao R, Muhammad A, Hou Y, Shi Z, 2018. PGRP-LB homolog acts as a negative modulator of immunity in maintaining the gut-microbe symbiosis of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier. *Dev. Comp. Immunol.*, 86: 65 – 77.

Dziarski R, 2004. Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Mol. Immunol.*, 40(12): 877 – 886.

Dziarski R, Gupta D, 2018. How innate immunity proteins kill bacteria and why they are not prone to resistance. *Curr. Genet.*, 64(1): 125 – 129.

Gao K, Deng XY, Qian HY, Qin GX, Hou CX, Guo XJ, 2014. Cloning and expression analysis of a peptidoglycan recognition protein in silkworm related to virus infection. *Gene*, 552(1): 24 – 31.

Ge Z, Han S, Cao X, Zhou J, Liu T, Liu Y, Li X, 2020. Isolation and biological characterization of a bacteriophage against *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. China*, https://doi.org/10.13344/j.microbiol.china.200697. [葛志毅, 韩生义, 曹小安, 周建华, 刘婷婷, 刘永生, 李学瑞, 2020. 一株金黄色葡萄球菌噬菌体的分离鉴定与生物学特性. 微生物学通报, https://doi.org/10.13344/j.microbiol.china.200697]

Haine ER, Moret Y, Siva-Jothy MT, Rolff J, 2008. Antimicrobial defence and persistent infection in insects. *Science*, 322(5905): 1257 – 1259.

Hultmark D, 2003. *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Curr. Opin. Immunol.*, 15(1): 12 – 19.

Li JH, Chang MX, Xue NN, Nie P, 2013. Functional characterization of a short peptidoglycan recognition protein, PGRP5 in grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Fish Shellfish Immunol.*, 35(2): 221 – 230.

Pearson AM, Baksa K, Rämet M, Protas M, McKee M, Brown D, Ezekowitz RA, 2003. Identification of cytoskeletal regulatory proteins required for efficient phagocytosis in *Drosophila*. *Microbes Infect.*, 5(10): 815 – 824.

Qi YX, Huang J, Li MQ, Wu YS, Xia RY, Ye GY, 2016. Serotonin modulates insect hemocyte phagocytosis via two different serotonin receptors. *eLife*, 5: e12241.

Royet J, Gupta D, Dziarski R, 2011. Peptidoglycan recognition proteins: modulators of the microbiome and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 11(12): 837 – 851.

Sharma P, Dube D, Singh A, Mishra B, Singh N, Sinha M, Dey S, Kaur P, Mitra DK, Sharma S, Singh TP, 2011. Structural basis of recognition of pathogen-associated molecular patterns and inhibition of proinflammatory cytokines by camel peptidoglycan recognition protein. *J. Biol. Chem.*, 286(18): 16208 – 16217.

Sharma P, Yamini S, Dube D, Singh A, Mal G, Pandey N, Sinha M,

Singh AK, Dey S, Kaur P, Mitra DK, Sharma S, Singh TP, 2013. Structural basis of the binding of fatty acids to peptidoglycan recognition protein, PGRP-S through second binding site. *Arch. Biochem. Biophys.*, 529(1): 1-10.

Tanaka H, Ishibashi J, Fujita K, Nakajima Y, Sagisaka A, Tomimoto K, Suzuki N, Yoshiyama M, Kaneko Y, Iwasaki T, 2008. A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(12): 1087-1110.

Wang Q, Ren M, Liu X, Xia H, Chen K, 2020. Identification and characterization of novel short-type BmPGRP-S4 from the silkworm, *Bombyx mori*, involved in innate immunity. *Z. Naturforsch. C*, 75(1-2): 13-21.

Werner T, Liu G, Kang D, Ekengren S, Steiner H, Hultmark D, 2000. A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(25): 13772-13777.

Yang J, Wang X, Tang S, Shen Z, Wu J, 2015. Peptidoglycan recognition protein S2 from silkworm integument: characterization, microbe-induced expression, and involvement in the immune-deficiency pathway. *J. Insect Sci.*, 15(1): 20.

Yang PJ, Zhan MY, Ye C, Yu XQ, Rao XJ, 2017. Molecular cloning and characterization of a short peptidoglycan recognition protein from silkworm *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.*, 26(6): 665-676.

Yoshida H, Kinoshita K, Ashida M, 1996. Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, 271(23): 13854-13860.

Zhang RN, Li CT, Ren FF, Ye MQ, Deng XJ, Yi HY, Cao Y, Yang WY, 2019. Functional characterization of short-type peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) from silkworm *Bombyx mori* in innate immunity. *Dev. Comp. Immunol.*, 95: 59-67.

Zhang RN, Ren FF, Zhou CB, Xu JF, Yi HY, Ye MQ, Deng XJ, Cao Y, Yu XQ, Yang WY, 2018. An ML protein from the silkworm *Bombyx mori* may function as a key. *Dev. Comp. Immunol.*, 88: 94-103.

Zhang Z, Long Q, Xie J, 2012. Roles of peptidoglycan recognition protein (PGRP) in immunity and implications for novel anti-infective measures. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, 22(3): 259-268.

Zhao S, Wang X, Cai S, Zhang S, Luo H, Wu C, Zhang R, Zhang J, 2018. A novel peptidoglycan recognition protein involved in the prophenoloxidase activation system and antimicrobial peptide production in *Antheraea pernyi*. *Dev. Comp. Immunol.*, 86: 78-85.

（责任编辑：马丽萍）